

اثر محافظتی سیلدنافیل بر تعداد و تحرک اسپرم های اپیدیدیمی سمت مقابل متعاقب ترومای غیر نافذ یک طرفه بیضه در موش نر نابالغ

رضا معینی مقدم^۱، علی شالیزار جلالی^{۱*}، غلامرضا نجفی^۱، مهدی بهفر^۲

^۱گروه علوم پایه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران؛ ^۲گروه رادیولوژی و تصویربرداری تشخیصی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۲۵

چکیده:

زمینه و هدف: ترومای غیر نافذ بیضه در درازمدت بر باروری اثرات سوئی بر جای می گذارد. مطالعه حاضر جهت ارزیابی کارایی سیلدنافیل در برابر آسیب های ناشی از این تروما در تعداد و تحرک اسپرم های اپیدیدیم سمت مقابل صورت گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۲۴ سر موش نر نابالغ به ۴ گروه ۶ سری تقسیم شدند. در ۲ گروه از موش ها، بیضه راست متعاقب باز کردن شکم روی سطح ثابت استریلی قرار داده شد و تروما به واسطه رها کردن وزنه ۵ گرمی استریل از ارتفاع ۱۰ سانتیمتری روی آن ایجاد گردید. یک گروه از گروه های فوق، روزانه ۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی سیلدنافیل را به مدت ۷ روز از روز ایجاد تروما دریافت می نمود. گروه شاهد و گروهی که تنها سیلدنافیل دریافت می کرد نیز در نظر گرفته شد. پس از گذشت ۷ هفته، خصوصیات اسپرم های اپیدیدیم سمت چپ مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: تروما کاهش معنی داری را در تعداد و میزان تحرک اسپرم ها در مقایسه با گروه شاهد موجب گردید ($P<0/05$). تجویز سیلدنافیل متعاقب تروما بهبود قابل ملاحظه ای را فراسنجه های فوق سبب گردید ($P<0/05$). نتیجه گیری: سیلدنافیل می تواند موجبات بهبود عوارض ناشی از ترومای غیر نافذ بیضه در اسپرم های اپیدیدیم سمت مقابل را فراهم آورد.

واژه های کلیدی: ترومای غیر نافذ، بیضه، سیلدنافیل، اسپرم اپیدیدیمی، موش.

مقدمه:

مردان نابارور به چشم می خورد (۵). بر این اساس، به منظور بررسی اثرات دراز مدت ترومای غیر نافذ بیضه بر روی باروری، بیضه طرف مقابل در مطالعات تجربی مورد ارزیابی قرار می گیرد (۶). مطالعاتی که در همین راستا صورت گرفته است نشان داده اند که ترومای غیر نافذ یک طرفه بیضه با کاهش میزان باروری و تخریب بافت بیضه طرف مقابل همراه است (۷). اگرچه مکانیسم دقیق اختلالات باروری ناشی از ترومای غیر نافذ یک طرفه بیضه به خوبی مشخص نشده است، شواهد متعددی نشان داده اند که ترومای

ترومای غیر نافذ بیضه که جراحات و صدمات ورزشی شایع ترین علت آن را تشکیل می دهند، می تواند پیامدهایی از کوفتگی تا پارگی کامل بافت بیضه را در پی داشته باشد (۱). شدید ترین موارد ترومای غیر نافذ بیضه به موجب فشرده شدن بیضه بر روی استخوان عانه، ران و یا هر دو روی می دهند (۲). آتروفی بافت بیضه که در ۵۰٪ از آسیب های یک طرفه رخ می دهد، موجبات اختلال در اسپرماتوژنز و ترشحات هورمونی را فراهم می آورد (۳، ۴). از سوی دیگر، وقوع ترومای بیضه در سابقه میزان بالایی از

غیر نافذ یک طرفه بیضه به واسطه ایجاد پاسخ های ایمونولوژیک، افزایش در نفوذ سلول های ایمنی و تولید سطوح بالای گونه های فعال اکسیژن، در روند بلوغ سلول های زایای بیضه طرف مقابل اختلال ایجاد کرده و سبب کاهش میزان باروری می گردد (۹،۸).

سیترا ت سیلدنافیل که با نام ویاگرا (Viagra) شناخته می شود، مهارکننده ای انتخابی برای فسفودی استراز نوع ۵ اختصاصی گوانوزین منوفسفات حلقوی (cGMP) محسوب می گردد و به گونه ای موثر در درمان اختلالات نعوظی مردان مورد استفاده قرار گرفته است (۱۰). علاوه بر این، این دارو امروزه در درمان افزایش فشار خون ریوی و سیستمیک، بیماری های قلبی- عروقی و دیابت نیز به کار گرفته می شود (۱۱). سیلدنافیل همچنین به واسطه مهار تولید گونه های فعال اکسیژن و سیتوکین های آماسی دارای خواص ضد التهابی نیز می باشد (۱۲،۱۳). به علاوه، مطالعات اخیر نشان داده است که سیلدنافیل دارای اثرات محافظتی قابل توجهی در برابر جراحات حاد بیضه بوده (۱۴،۱۵) و قادر به افزایش کارایی سیستم دفاع آنتی اکسیدانت بافت بیضه می باشد (۱۶).

بر این اساس، مطالعه حاضر به منظور ارزیابی کارایی سیلدنافیل که دارای خواص آنتی اکسیدانت و ضد التهابی می باشد، در برابر آسیب های ناشی از ترومای غیر نافذ یک طرفه بیضه در تعداد و تحرک اسپرم های اپیدیدیم سمت مقابل صورت پذیرفت.

روش بررسی:

برای انجام این مطالعه تجربی، تعداد ۲۴ سر موش سفید کوچک آزمایشگاهی نر نابالغ با میانگین وزنی 10 ± 3 گرم از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه گردید. حیوانات تحت شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای 25 ± 2 درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی 50 ± 10 درصد نگهداری شدند. تمام حیوانات در شرایط تغذیه ای یکسان با

ذرت، گندم، جو و پلت به نسبت های برابر تغذیه شدند و امکان دسترسی آزاد به آب نیز برای تمامی آن ها وجود داشت. متعاقب ۱ هفته سازگاری با شرایط محیط، حیوانات به صورت تصادفی به ۴ گروه ۶ سری به شکل زیر تقسیم شدند:

گروه شاهد: در حیوانات این گروه، متعاقب بیهوشی با کتامین به میزان ۳۷/۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی، برشی عرضی در قسمت خلفی شکم ایجاد و بلافاصله بدون دستکاری بیضه ها، برش مذکور بخیه شد.

گروه ترومای غیر نافذ: در حیوانات این گروه، پس از باز کردن شکم، بیضه راست بر روی یک سطح ثابت استریل قرار داده شد و ترومای غیر نافذ به واسطه رها کردن یک وزنه ۵ گرمی استریل از ارتفاع ۱۰ سانتیمتری بر روی آن ایجاد شد (۸). در نهایت پس از باز گرداندن بیضه به موقعیت طبیعی، برش ناحیه شکم بخیه گردید.

گروه ترومای غیر نافذ + سیلدنافیل: در این گروه نیز ترومای غیر نافذ یک طرفه بیضه ایجاد گردید؛ اما حیوانات این گروه روزانه ۰/۱ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی داروی سیلدنافیل را به مدت ۷ روز از روز ایجاد تروما دریافت کردند.

گروه سیلدنافیل: حیوانات این گروه روزانه ۰/۱ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی داروی سیلدنافیل را به مدت ۷ روز از روز ایجاد تروما در گروه هایی که تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند، دریافت کردند.

مدت زمان این مطالعه نیز ۷ هفته در نظر گرفته شد. پس از آسان کشی موش ها، به منظور ارزیابی خصوصیات اسپرم ابتدا اپیدیدیم زیر لوپ با بزرگنمایی ۲۰ برابر از بافت بیضه جدا شده و بافت های اطراف آن تمیز گردید؛ بلافاصله دم اپیدیدیم درون پتری دیش های حاوی یک میلی لیتر محیط کشت (Human Tubal Fluid= HTF) قرارگرفت. برای

$n \times 5000 \times d$ و توسط میکروسکوپ نوری با درشت نمایی ۴۰۰ برابر محاسبه گردید که n تعداد اسپرم های شمارش شده در پنج مربع متوسط هموسیتمتر و d عکس رقت سوسپانسیون حاوی اسپرم می باشد (۱۸).

داده های این مطالعه با استفاده از بسته نرم افزاری SPSS مورد ارزیابی آماری قرار گرفتند. جهت مقایسه بین گروه ها آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن تست های مقایسه ای چندگانه توکی مورد استفاده قرار گرفت. مقدار $P < 0.05$ برای تعیین سطح معنی داری بین گروه ها در نظر گرفته شد.

یافته ها:

ترومای غیرنافذ یکطرفه بیضه، در مقایسه با گروه شاهد، موجب کاهش معنی داری در میزان تحرک و تعداد اسپرم های اپیدیدیم طرف مقابل گردید ($P < 0.05$). در مقایسه با گروه ترومای غیر نافذ یک طرفه، درمان با داروی سیلدنافیل در موش های نر افزایش معنی داری را در تعداد و میزان تحرک اسپرم ها در پی داشت ($P < 0.05$ ، جدول شماره ۱).

جلوگیری از ایجاد شوک حرارتی و آسیب به اسپرم ها، تمام وسایل مورد استفاده و محیط کشت قبل از مصرف در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شدند؛ سپس دم اپیدیدیم در داخل محیط کشت به قطعات کوچک خرد شده و به مدت ۲۰ دقیقه در درون محیط کشت در انکوباتور باقی ماند تا امکان خروج اسپرم ها از اپیدیدیم فراهم آید. در نهایت سوسپانسیون حاوی اسپرم با استفاده از محیط کشت به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق گردید. جهت تعیین درصد تحرک اسپرم ها، یک قطره از محلول رقیق شده فوق بر روی لام میکروسکوپی قرار داده شد و ۱۰ عدد میدان دید میکروسکوپی با درشت نمایی ۴۰۰ برابر مورد بررسی قرار گرفت؛ سپس میانگین کل اسپرم های متحرک نسبت به کل اسپرم های قابل رویت در این ۱۰ میدان دید به عنوان درصد تحرک ثبت گردید (۱۷). به منظور شمارش تعداد اسپرم ها از هموسیتمتر استفاده شد. ۱۰ میکرولیتر از محلول رقیق شده اسپرم بر روی هموسیتمتر قرار گرفته و به مدت ۵ دقیقه بدون حرکت گذاشته شد تا تحرک اسپرم ها کاهش یابد. تعداد اسپرم ها در هر میلی لیتر با استفاده از فرمول

جدول شماره ۱: مقایسه میانگین تعداد و تحرک اسپرم های اپیدیدیمی در گروه های مختلف آزمایشی

متغیر	گروه*	شاهد	سیلندنافیل	ترومای غیر نافذ	ترومای غیر نافذ + سیلندنافیل
تعداد اسپرم (میلی لیتر/۱۰ ^۶)	۳۰/۰۰±۱/۱۵ ^a	۳۳/۶۶±۰/۸۸ ^a	۱۲/۶۶±۰/۸۸ ^b	۲۳/۳۳±۰/۸۸ ^c	
میزان تحرک اسپرم (%)	۷۹/۳۳±۲/۰۲ ^a	۸۱/۶۶±۰/۸۸ ^a	۳۹/۳۳±۱/۷۶ ^b	۷۰/۳۳±۱/۴۵ ^c	

* $n=6$ در هر گروه می باشد؛ حروف غیر مشابه در هر متغیر نمایانگر اختلاف معنی دار در سطح $P < 0.05$ می باشد؛ داده ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار می باشد.

بحث:

همیشه با آسیب به بیضه سمت مقابل در نظر گرفته می شود، چراکه شواهدی وجود دارند که نشان می دهند ترومای یک طرفه بیضه بر روی بلوغ سلول های زایای بیضه طرف مقابل به واسطه پاسخ های ایمنی تأثیر

شایع ترین عامل ترومای غیر نافذ بیضه، آسیب ها و صدماتی است که در طی ورزش اتفاق می افتند و بیشتر این تروماهای غیر نافذ به صورت یک طرفه می باشند (۱). ترومای یک طرفه بیضه،

می گذارد (۱۹،۷). بلوغ بیضه ها تا زمان بلوغ جنسی فرد کامل نمی شود و هر آسیبی به بیضه نابالغ ممکن است، به بلوغ اسپرماتوژنز در دوره های بعد آسیب بزند (۶). آسیب بیضه منجر به بروز واکنش های فعال کننده سیستم سمپاتیک، آزاد سازی آنزیم های آکروزومی، شکل گیری مکانیسم های ایمنی، ایجاد رادیکال های آزاد، تولید بیش از اندازه اکسید نیتریک و کاهش و تغییر در جریان خون بیضه سمت مقابل می شود که این تغییر و کاهش جریان خون در بیضه سمت مقابل خود با تولید گونه های فعال اکسیژن و آسیب بافتی همراه می باشد (۲۰). مطالعات پیشین نشان داده است که آسیب بیضه ناشی از پیچش دو ساعته، در بیضه، اپیدیدیم و دفران سمت مقابل تأثیر می گذارد و نیز ترومای یک طرفه بیضه به دلیل آسیب به سمت مقابل موجب ناباروری می شود که این ناباروری می تواند نتیجه آسیب اپیدیدیم و همچنین تغییر در تحرک اسپرم ها باشد (۱۷). در مطالعه حاضر، ترومای غیر نافذ یک طرفه بیضه، در مقایسه با گروه شاهد، موجب کاهش در میزان تحرک و تعداد اسپرم در اپیدیدیم نا همسو گردید که در تأیید گزارشات پیشین می باشد (۹،۸). تجویز داروی سیلدنافیل متعاقب ایجاد تروما در موش های نر، افزایش بارزی را در تعداد و میزان تحرک اسپرم ها در مقایسه با گروه ترومای غیر نافذ یک طرفه بیضه در پی داشت. به نظر می رسد سیلدنافیل و دیگر مهار کننده های فسفودی استراز به واسطه مهار تولید گونه های فعال اکسیژن (۱۲) و کاهش تولید سیتوکین های آماسی (۱۳) دارای ویژگی های آنتی اکسیدانت و ضد التهابی بوده و می توانند در بهبود

عوارض ناشی از تروما در دستگاه تولید مثلی نر واجد کارایی باشند. همچنان که بررسی های صورت گرفته در گذشته نیز نشان داده اند که سیلدنافیل به مدد دارا بودن خصوصیات مذکور در برابر آسیب های ناشی از پیچش و ایسکمی - خونرسانی مجدد تجربی در موش های صحرایی دارای اثرات محافظتی بوده (۱۵،۱۴) و قادر به افزایش کارایی سیستم دفاع آنتی اکسیدانت بافت بیضه موش های صحرایی (۱۶) و تشدید فعالیت غده ای پروستات موش به واسطه افزایش سطوح سرمی تستوسترون (۱۱) می باشد.

نتیجه گیری:

بر اساس یافته های مطالعه حاضر چنین به نظر می رسد که ترومای غیر نافذ یک طرفه بیضه احتمالاً از طریق بر هم زدن تعادل اکسیداسیون- احیاء، موجب بروز تنش های اکسیداتیو می گردد که این امر آسیب دستگاه تولید مثلی نر را در پی خواهد داشت. حال آن که داروی سیلدنافیل به سبب دارا بودن ویژگی های آنتی اکسیدانت و ضد التهابی، قادر به ایجاد محافظت نسبی در برابر اثرات نامطلوب ترومای غیر نافذ یک طرفه بیضه در دستگاه تولید مثلی نر می باشد. با این وجود، آشکار شدن کارایی درمانی سیلدنافیل در موارد بالینی نیازمند مطالعات گسترده تری می باشد.

تشکر و قدردانی:

نگارندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از دانشگاه ارومیه به سبب تأمین مالی این مطالعه اعلام می دارند.

منابع:

1. Schuster G. Traumatic rupture of the testicle and a review of the literature. J Urol. 1982; 127(6): 1194-6.
2. MacDermott JP, Gray BK, Stewart PA. Traumatic rupture of the testis. Br J Urol. 1988; 62(2): 179-81.
3. Tai YS, Chen YS, Tsai PK, Wong WJ. Traumatic testicular dislocation: A rare occurrence of blunt scrotal injury. Urol Sci. 2014; 25(4): 158-60.

4. Gadda F, Spinelli MG, Cozzi G, Paffoni A, Carmignani L, Rocco F. Emergency testicular sperm extraction after scrotal trauma in a patient with a history of contralateral orchiopexy for cryptorchidism: case report and review of the literature. *Fertil Steril*. 2012; 97(5): 1074-7.
5. Noltén WE, Viosca SP, Korenman SG, Mardi R, Shapiro SS. Association of elevated estradiol with remote testicular trauma in young infertile men. *Fertil Steril*. 1994; 62(1): 143-9.
6. Srinivas M, Hashim S, Mitra DK. Unilateral blunt testicular trauma in pre-pubertal rats. *Pediatr Surg Int* 1999; 15(7): 457-60.
7. Shaul DB, Xie HW, Diaz JF, Mahnovski V, Hardy BE. Surgical treatment of testicular trauma: effects on fertility and testicular histology. *J Pediatr Surg*. 1997; 32(1): 84-7.
8. Sharma RB, Srinivas M, Mitra DK, Das SN. T-lymphocyte subsets in the contralateral testis after unilateral blunt testicular trauma in pre-pubertal mice. *Pediatr Surg Int*. 1999; 15(3-4): 238-9.
9. Srinivas M, Degaonkar M, Jagannathan NR, Misro MM, Chaki SP, Gupta DK. Protective role of cyclosporine in experimental unilateral blunt testicular trauma: evaluation by ³¹P MR spectroscopy. *Pediatr Surg Int*. 2003; 19(6): 467-70.
10. Shams A, Hashish H. The histopathological effect of sildenafil citrate on superior colliculus of adult male rat. *J Interdiscipl Histopathol*. 2013; 1(4): 175-83.
11. Gomes FO, Carvalho Mda C, Saraiva KL, Ribeiro EL, AK ES, Donato MA, et al. Effect of chronic sildenafil treatment on the prostate of C57Bl/6 mice. *Tissue Cell*. 2014; 46(6): 439-49.
12. Muzaffar S, Shukla N, Srivastava A, Angelini GD, Jeremy JY. Sildenafil citrate and sildenafil nitrate (NCX 911) are potent inhibitors of superoxide formation and gp91phox expression in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Br J Pharmacol*. 2005; 146(1): 109-17.
13. Toward TJ, Smith N, Broadley KJ. Effect of phosphodiesterase-5 inhibitor, sildenafil (Viagra), in animal models of airways disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 169(2): 227-34.
14. Halawa AM. Effect of sildenafil administration on ischemia/ reperfusion of the testis in adult albino rat light and electron microscopic study. *Egypt J Histol*. 2010; 33: 380-95.
15. Yildiz H, Durmus AS, Simsek H, Yaman M. Protective effect of sildenafil citrate on contralateral testis injury after unilateral testicular torsion/detorsion. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011; 66(1): 137-42.
16. Akintunde J, Ajiboye JA, Siemuri EO, Oyelowo SB, Sunday OJ, Abam EO, et al. Sub-chronic treatment of sildenafil citrate (Viagra) on some enzymatic and nonenzymatic antioxidants in testes and brain of male rats. *J Pharm Drug Deliv Res*. 2012; 1: 1-5.
17. Aktas BK, Bulut S, Bulut S, Baykam MM, Ozden C, Senes M, et al. The effects of N-acetylcysteine on testicular damage in experimental testicular ischemia/reperfusion injury. *Pediatr Surg Int*. 2010; 26(3): 293-8.
18. Jalali AS, Hasanzadeh S, Malekinejad H. *Achillea millefolium* inflorescence aqueous extract ameliorates cyclophosphamide-induced toxicity in rat testis: stereological evidences. *Chin J Nat Med*. 2012; 10(4): 247-54.
19. Razie S, Panahi M, Ahangarpour A, Rahim F, Saki G. Study of level of inhibit B and ultrastructure of Sertoli cells in contralateral testis after unilateral blunt testis trauma in rat. *Asian J Biol Sci*. 2011; 4(1): 70-6.
20. Andiran F, Okur DH, Kiliç A, Gedikoglu G, Kiliç K, Tanyel FC. Do experimentally induced ipsilateral testicular torsion, vas deferens obstruction, intra-abdominal testis or venous obstruction damage the contralateral testis through a common mechanism? *BJU Int*. 2000; 85(3): 330-5.

Protective effects of *Sildenafil* on contralateral epididymal sperm count and motility following unilateral blunt testicular trauma in prepubertal male mice

Moeini Moghadam R¹, Shalizar Jalali A^{1*}, Najafi G¹, Behfar M²

¹Basic Sciences Dept., Urmia University, Urmia, I.R. Iran; ²Surgery and Diagnostic Imaging Dept., Urmia University, Urmia, I.R. Iran.

Received: 6/Dec/2014

Accepted: 14/Feb/2015

Background and aims: Blunt testicular trauma adversely affects fertility in later periods. The aim of the present study was to examine sildenafil effects on contralateral epididymal sperm count and motility following unilateral blunt testicular trauma in mice.

Methods: In this experimental study, 24 prepubertal male mice were distributed into 4 groups of 6 mice each. In 2 groups of mice, the abdomen was opened and the right testis was placed on a sterile firm surface and 5 g sterile weight was dropped on the testis from a height of 10 cm. One of these above mentioned groups received sildenafil (0.1 mg/kg daily) intraperitoneally for 7 days from the beginning of induction day of trauma. A control group and a sildenafil control group were also included that they received only sildenafil. The left epididymal sperm characteristics of all animals were evaluated after 7 weeks.

Results: A significant decrease in the sperm count and motility was observed in trauma group compared to control mice ($P<0.05$). Sildenafil administration markedly ameliorated all changes in the above-mentioned parameters ($P<0.05$).

Conclusion: Sildenafil administration could reduce complications resulted from blunt testicular trauma in contralateral epididymal sperms.

Keywords: Blunt trauma, Testis, Sildenafil, Epididymal Sperm, Mice.

Cite this article as: Moeini Moghadam R, Shalizar Jalali A, Najafi G, Behfar M. Protective effects of Sildenafil on contralateral epididymal sperm count and motility following unilateral blunt testicular trauma in prepubertal male mice. J Shahrekord Univ Med Sci. 2015; 17(4): 11-16.

***Corresponding author:**

Basic Sciences Dept., Urmia University, Urmia, I.R. Iran, Tel: 00989111166004,
E-mail: ali_shalizar@yahoo.com